



TITLE:

Development of Immunostimulatory Motif-containing DNA-based Delivery System for Drugs and Antigens( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Mizuno(Ishii), Yumiko

---

CITATION:

Mizuno(Ishii), Yumiko. Development of Immunostimulatory Motif-containing DNA-based Delivery System for Drugs and Antigens. 京都大学, 2016, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19667>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-07-16に公開

京都大学	博士（薬科学）	氏名	水野 友美子
論文題目	Development of Immunostimulatory Motif-containing DNA-based Delivery System for Drugs and Antigens（免疫刺激性モチーフを含むDNAを基盤とする薬物および抗原デリバリーシステムの開発に関する研究）		
<p>細菌やウイルスに由来する非メチル化CpG配列（CpGモチーフ）は、生体の免疫担当細胞に発現するToll-like receptor 9（TLR9）を介して認識され、種々の自然免疫応答を引き起こす。この活性化は感染防御や免疫バランスの改善、癌細胞の増殖抑制などに関与することから、近年、種々の疾患に対してCpGモチーフを含むDNA（CpG DNA）をアジュバントとして利用する治療法の開発が試みられている。しかしながら、CpG DNAをドラッグデリバリーシステム（DDS）のキャリアとして利用した製剤の開発およびその製剤の各種疾患治療における有用性については明らかとされていなかった。そこで申請者は、CpG DNAと薬物および抗原の同時デリバリーを可能とするDDSの開発を目的として、CpG DNAをキャリアとした製剤を開発し、その疾患治療システムとしての応用を試みた。</p>			
<p><b>第一章 免疫刺激性モチーフを含むプラスミドDNAを基盤とする抗癌剤DDSの開発</b></p> <p>pDNAは非ウイルス性で生産性の高いベクターとして遺伝子治療やDNAワクチン療法への利用が期待されている。また細菌由来であるが故にCpGモチーフを大量に含んでいることから、申請者は、プラスミドDNA（pDNA）をキャリアとしたCpG DNAおよび抗癌剤ドキシソルビシン（DXR）のデリバリーシステムの開発を試みた。まずDXRをpDNAにインターカレートさせてpDNA/DXR複合体を作製した。pDNA/DXR複合体はマウスマクロファージ様RAW264.7細胞と共培養したマウス結腸癌細胞株colon26の増殖を、CpGモチーフに依存して効率よく抑制した。また肝転移マウスに投与したところ、pDNA/DXR複合体は高いレベルの抗腫瘍サイトカインIL-12の産生を誘導し、DXR単独投与と比較して効率的に癌組織にDXRをデリバリーした。さらにpDNA/DXR複合体はDXRと比較してより高い肝臓での癌細胞増殖抑制効果を示した。以上より、癌免疫・化学療法に利用可能なpDNAをキャリアとした抗癌剤DDSの開発に成功した。</p>			
<p><b>第二章 免疫刺激性モチーフを含む多足型核酸構造体を利用して作製したDNAハイドロゲルを基盤とする抗原デリバリーシステムの開発</b></p> <p><b>第一節 免疫刺激性DNAハイドロゲルによる経鼻抗原デリバリーシステムの開発</b></p> <p>第一章ではpDNAをキャリアとして用いたが、臨床応用における安全性の観点では、全合成DNAの方が望ましい。病態情報薬学分野では、これまでに、合成オリゴデオキシヌクレオチドを用いてDNAの5'-突出末端に相補的な塩基配列を導入した多足型核酸構造体polypodnaを開発することで、注射やスプレー投与が可能な「自己ゲル化核酸」の開発に成功してきた。そこで第二章では、CpGモチーフを含む免疫刺激性DNAハイドロゲルのアレルギー疾患治療への応用を試みた。CpG DNAおよびスギ花粉主要抗原Cryj1の経鼻デリバリーシステムの開発を目的として、Cryj1内包免疫刺激性 DNAハイドロゲルを設計し、その物性</p>			

および生理活性を評価した。Cryj1はハイドロゲルから徐放され、マウス経鼻投与後、Cryj1単独投与と比較して長時間鼻腔内に滞留した。またCryj1内包免疫刺激性ハイドロゲルはマウスへの経鼻投与後、抗アレルギーサイトカインIL-12を効率的に誘導し、さらにCryj1特異的免疫応答を効率的に誘導した。以上より、免疫刺激性DNAハイドロゲルが経鼻抗原デリバリーシステムのキャリアとして有用であることを見出した。

## 第二節 免疫刺激性DNAハイドロゲルによる抗原徐放デリバリーシステムの最適化

CpG DNAおよび抗原の徐放化能の増強が効率的な抗原特異的免疫の誘導に有用であることが報告されている。そこで申請者は、より効率的な抗原デリバリーシステムの開発を目的として、免疫刺激性DNAハイドロゲルにポリマーを配合することによる徐放化機能の最適化を検討した。カチオン性ポリマーであるキトサンを配合することでDNAハイドロゲルの崩壊遅延化、DNA分解酵素に対する安定化が可能であった。DNAハイドロゲルの構造変化について検討したところ、Tm値が向上し接着末端が安定化した粘度の高いゲルになっていることが分かった。さらにモデル抗原OVAを封入して徐放性を評価したところ、抗原徐放性の改善が示された。これらの結果はキトサン配合免疫刺激性DNAハイドロゲルがより効果的な免疫療法のためのDDSキャリアとして有効であることを示唆するものである。

以上、申請者は、CpG DNAをキャリアとした製剤が、免疫活性化シグナルと薬物および抗原の効率的なデリバリーにより、癌およびアレルギー免疫療法に有効であることを実証した。また、安定かつ徐放機能を改善可能な免疫刺激性DNAハイドロゲルの開発にも成功した。本研究で開発した免疫刺激性DDSは、癌やアレルギー疾患などに対する有用な新規疾患治療システムとなるものと期待する。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、非メチル化CpG配列 (CpGモチーフ) を含むDNA (CpG DNA) と薬物および抗原の同時デリバリーを可能とするDDSの開発を目的として、CpG DNAをキャリアとした製剤を開発し、以下の二章に渡りその疾患治療システムとしての応用を試みた。

## 第一章 免疫刺激性モチーフを含むプラスミドDNAを基盤とする抗癌剤DDSの開発

申請者は、プラスミドDNA (pDNA) をキャリアとしたCpG DNAおよび抗癌剤ドキソルビシン (DXR) のデリバリーシステムの開発を試みた。インターカレーションにより作製したpDNA/DXR複合体はマウスマクロファージ様RAW264.7細胞と共培養したマウス結腸癌細胞株coln26の増殖を、CpGモチーフに依存して効率よく抑制した。また肝転移マウスに投与したところ、pDNA/DXR複合体は高いレベルの抗腫瘍サイトカインIL-12の産生を誘導し、DXR単独投与と比較して効率的に癌組織にDXRをデリバリーした。さらにpDNA/DXR複合体はDXRと比較してより高い肝臓での癌細胞増殖抑制効果を示した。

## 第二章 免疫刺激性モチーフを含む多足型核酸構造体を利用して作製したDNAハイドロゲルを基盤とする抗原デリバリーシステムの開発

### 第一節 免疫刺激性DNAハイドロゲルによる経鼻抗原デリバリーシステムの開発

申請者は、CpGモチーフを含む免疫刺激性DNAハイドロゲルのアレルギー疾患治療への応用を試みた。CpG DNAおよびスギ花粉主要抗原Cryj1の経鼻デリバリーシステムの開発を目的として、Cryj1内包免疫刺激性 DNAハイドロゲルを設計し、その物性および生理活性を評価した。Cryj1はハイドロゲルから徐放され、マウス経鼻投与後、Cryj1単独投与と比較して長時間鼻腔内に滞留した。またCryj1内包免疫刺激性ハイドロゲルはマウスへの経鼻投与後、抗アレルギーサイトカインIL-12を効率的に誘導し、さらにCryj1特異的免疫応答を効率的に誘導した。

### 第二節 免疫刺激性DNAハイドロゲルによる抗原徐放デリバリーシステムの最適化

申請者は、より効率的な抗原デリバリーシステムの開発を目的として、免疫刺激性DNAハイドロゲルにポリマーを配合することによる徐放化機能の最適化を検討した。カチオン性ポリマーであるキトサンを配合することでDNAハイドロゲルの崩壊遅延化、DNA分解酵素に対する安定化が可能であった。DNAハイドロゲルの構造変化について検討したところ、Tm値が向上し接着末端が安定化した粘度の高いゲルになっていることが分かった。さらにモデル抗原OVAを封入して徐放性を評価したところ、抗原徐放性の改善が示された。

以上、申請者は、CpG DNAをキャリアとした製剤が、免疫活性化シグナルと薬物および抗原の効率的なデリバリーにより、癌およびアレルギー免疫療法に有効であることを実証した。また、安定かつ徐放機能を改善可能な免疫刺激性DNAハイドロゲルの開発にも成功した。本研究で開発した免疫刺激性DDSは、癌やアレルギー疾患などに対する有用な新規疾患治療システムとなるものと期待される。

よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表

に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降